

た。

雄に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。また、観察期間を通して一般状態、体重および摂餌量に投与による影響はみられなかった。投与期間終了時の尿検査、血液学検査および血液生化学検査においても、投与による影響は認められなかった。また、剖検所見、器官重量および病理組織学的検査にも投与による影響は認められなかった。

雌に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。また、観察期間を通して一般状態および体重に投与による影響はみられなかった。なお、1000 mg/kg群で哺育期に摂餌量の一過性の高値がみられたが、体重推移に異常の認められない変化であり、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンによる影響とは考えられない。また、剖検所見および器官重量にも投与による影響は認められなかった。病理組織学検査において、1000 mg/kg群で肝臓に髄外造血が2例みられた。しかし、他の器官・組織に病理組織学変化は認められないこと、髄外造血は2例でごく軽度認められているのみであることから、軽微な変化と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように1000 mg/kg群でも、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膈および乳腺に病理組織学変化は認められなかった。また、発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠黄体数、着床数、着床率、出産率、妊娠期間、分娩状態および哺育状態では、投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

児動物に対しては、総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率に投与に起因すると思われる変化はみられなかった。新生児の外表観察において、投与に起因する異常はみられなかった。児動物の体重では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。児動物の剖検では、いずれの群とも異常はみられなかった。

以上のように、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンの一般毒性学的無影響量は、雄では1000 mg/kg投与しても毒性学的影響が認められなかったことから1000 mg/kg/dayと考えられる。また、雌では1000 mg/kg投与により肝臓に髄外造血が認められたことから300 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性学的な無影響量は、1000 mg/kg投与しても雌雄親動物、児動物とも影響は認められなかったことからいずれも1000 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 古橋忠和ほか、未公開。

連絡先

試験責任者：古橋忠和

試験担当者：三輪芳久、長瀬孝彦、牧野浩平、

内藤一嘉、木村 均、岡田雅昭

(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)

Yoshihisa Miwa, Takahiko Nagase,

Kohei Makino, Kazuyoshi Naito,

Hitoshi Kimura and Masaaki Okada

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-

6251, Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

Table 1 Urinary examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	12
Volume (mL) : Mean±S.D.	14.69 ± 6.20	19.23 ± 5.21	18.92 ± 3.65	15.20 ± 3.55	14.59 ± 6.74
Specific gravity: Mean±S.D.	1.0525 ± 0.0175	1.0495 ± 0.0120	1.0471 ± 0.0084	1.0568 ± 0.0097	1.0598 ± 0.0129
Color					
Light yellow	12	12	12	12	12
pH					
7.0	0	0	0	0	1
7.5	1	0	1	1	0
8.0	1	1	4	1	1
8.5	7	8	5	4	7
9.0	3	3	2	6	3
Protein					
Negative	0	1	2	0	0
10~20 mg/dL	2	5	4	3	0
30 mg/dL	5	4	3	2	7
100 mg/dL	5	2	3	7	5
Glucose					
Negative	12	12	12	12	12
Ketone body					
Negative	7	11	11	5	2
Slight	5	1	1	7	10
Bilirubin					
Negative	12	12	12	12	12
Occult blood					
Negative	11	10	11	12	11
Trace	0	2	0	0	1
Slight	0	0	1	0	0
Marked	1	0	0	0	0
Urobilinogen					
Normal	12	12	12	12	12
Urinary sediments					
Epithelial cells					
0~20 cells/100 fields	10	12	10	9	11
21~100 cells/100 fields	2	0	2	3	1
Erythrocytes					
0~20 cells/100 fields	11	11	12	12	12
21~100 cells/100 fields	0	1	0	0	0
201~500 cells/100 fields	1	0	0	0	0
Leukocytes					
0~20 cells/100 fields	12	12	12	12	12
Casts					
Not observed	12	12	12	12	12
Crystals					
Not observed	6	5	7	4	5
Observed	6	7	5	8	7

Table 2 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
RBC	(10 ⁶ /μL)	848.3 ± 47.3	849.1 ± 43.7	843.3 ± 35.9	835.7 ± 32.0	836.7 ± 53.8
Hemoglobin	(g/dL)	15.46 ± 0.48	15.67 ± 0.77	15.54 ± 0.66	15.35 ± 0.58	15.39 ± 0.69
Hematocrit	(%)	46.00 ± 1.72	46.90 ± 2.62	46.36 ± 2.29	45.56 ± 1.84	45.82 ± 2.66
MCV	(μm ³)	54.30 ± 1.42	55.27 ± 1.44	55.00 ± 1.95	54.54 ± 1.77	54.81 ± 1.55
MCH	(pg)	18.25 ± 0.69	18.45 ± 0.59	18.44 ± 0.61	18.37 ± 0.69	18.43 ± 0.62
MCHC	(g/dL)	33.61 ± 0.53	33.41 ± 0.40	33.55 ± 0.42	33.70 ± 0.48	33.62 ± 0.56
Platelet	(10 ³ /μL)	101.75 ± 11.94	99.74 ± 9.39	100.69 ± 6.93	95.00 ± 6.38	106.54 ± 8.76
Reticulocyte	(%)	27.0 ± 4.6	28.0 ± 4.8	26.5 ± 5.8	27.1 ± 4.8	25.4 ± 3.8
PT	(sec.)	20.98 ± 4.17	19.96 ± 3.97	20.94 ± 4.79	20.33 ± 3.10	20.80 ± 4.97
APTT	(sec.)	32.61 ± 4.55	30.71 ± 2.17	31.57 ± 3.51	31.62 ± 2.70	32.49 ± 4.50
Fibrinogen	(mg/dL)	227.5 ± 22.7	228.0 ± 16.4	226.5 ± 17.6	228.3 ± 9.1	217.2 ± 15.8
WBC	(10 ³ /μL)	70.8 ± 18.4	68.2 ± 15.6	62.9 ± 15.6	67.1 ± 18.3	66.8 ± 19.4
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte		91.4 ± 4.4	91.5 ± 3.8	91.0 ± 4.9	90.7 ± 4.1	90.8 ± 5.2
Neutrophil		7.4 ± 4.0	7.5 ± 4.0	8.4 ± 4.7	8.4 ± 3.6	8.4 ± 4.9
Eosinophil		0.8 ± 0.8	0.5 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.6 ± 1.2	0.3 ± 0.7
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte		0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.7	0.5 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Table 3 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
AST	(IU/L)	90.47 ± 16.03	93.92 ± 14.12	98.22 ± 16.70	90.08 ± 15.70	90.06 ± 12.32
ALT	(IU/L)	30.65 ± 5.19	32.22 ± 6.11	33.33 ± 6.61	30.48 ± 2.54	30.33 ± 5.39
ALP	(IU/L)	346.93 ± 70.40	316.90 ± 46.91	312.46 ± 46.92	346.17 ± 69.79	303.48 ± 46.26
γ-GTP	(IU/L)	1.133 ± 0.217	1.254 ± 0.166	1.179 ± 0.163	1.104 ± 0.176	1.106 ± 0.110
T-protein	(g/dL)	5.34 ± 0.17	5.35 ± 0.17	5.33 ± 0.19	5.38 ± 0.13	5.28 ± 0.21
Albumin	(g/dL)	2.718 ± 0.135	2.711 ± 0.083	2.718 ± 0.082	2.738 ± 0.086	2.698 ± 0.105
A/G ratio		1.038 ± 0.074	1.031 ± 0.068	1.044 ± 0.044	1.037 ± 0.051	1.049 ± 0.067
T-bilirubin	(mg/dL)	0.127 ± 0.023	0.119 ± 0.018	0.124 ± 0.019	0.119 ± 0.025	0.128 ± 0.024
BUN	(mg/dL)	17.43 ± 1.63	18.13 ± 1.06	17.59 ± 1.67	17.07 ± 1.21	19.24 ± 2.80
Creatinine	(mg/dL)	0.275 ± 0.025	0.270 ± 0.029	0.264 ± 0.024	0.263 ± 0.023	0.259 ± 0.024
Glucose	(mg/dL)	114.68 ± 11.91	114.03 ± 9.29	112.98 ± 8.28	114.37 ± 8.60	113.81 ± 9.29
T-Cholesterol	(mg/dL)	51.62 ± 10.80	56.73 ± 11.50	49.73 ± 15.49	56.21 ± 11.91	49.32 ± 8.92
Triglyceride	(mg/dL)	32.33 ± 15.68	32.94 ± 12.43	31.44 ± 12.99	41.11 ± 8.44	38.60 ± 17.56
Na	(mEq/L)	146.53 ± 1.11	146.23 ± 0.90	146.34 ± 1.25	145.98 ± 1.15	146.20 ± 1.76
K	(mEq/L)	4.453 ± 0.163	4.550 ± 0.180	4.572 ± 0.217	4.532 ± 0.189	4.527 ± 0.203
Cl	(mEq/L)	107.96 ± 0.88	107.52 ± 0.87	107.72 ± 1.50	107.57 ± 1.04	107.53 ± 1.40
Ca	(mg/dL)	9.16 ± 0.27	9.14 ± 0.21	9.18 ± 0.29	9.18 ± 0.21	9.14 ± 0.19
Inorganic-p	(mg/dL)	7.34 ± 0.56	7.41 ± 0.46	7.41 ± 0.55	7.53 ± 0.51	7.77 ± 0.79

Each value shows mean ± S.D.

Table 4 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris (2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
Body weight	(g)	455.8±27.1	455.3±24.8	453.8±25.3	463.8±25.3	461.3±28.6
Brain	(g)	2.072±0.087	2.121±0.086	2.068±0.070	2.094±0.076	2.082±0.073
	(g%)	0.456±0.033	0.468±0.028	0.457±0.026	0.453±0.025	0.453±0.031
Pituitary	(mg)	14.12±1.96	14.63±1.25	13.98±1.17	14.28±1.67	13.81±2.06
	(mg%)	3.09±0.40	3.22±0.23	3.09±0.23	3.08±0.30	2.99±0.50
Thyroids	(mg)	19.40±3.82	19.34±3.89	18.60±1.93	20.57±3.74	18.25±3.97
	(mg%)	4.26±0.83	4.23±0.67	4.12±0.53	4.43±0.79	3.99±0.94
Thymus	(mg)	310.96±78.25	317.95±91.18	268.24±47.59	336.78±65.34	287.72±63.50
	(mg%)	67.98±16.47	69.88±19.86	59.38±11.74	72.55±13.18	62.48±14.06
Heart	(g)	1.367±0.128	1.480±0.127	1.435±0.198	1.451±0.111	1.440±0.143
	(g%)	0.298±0.031	0.324±0.022	0.315±0.032	0.314±0.032	0.313±0.026
Liver	(g)	10.939±0.947	11.758±1.310	11.519±1.316	11.658±0.949	11.926±1.672
	(g%)	2.399±0.096	2.580±0.184	2.533±0.174	2.515±0.151	2.578±0.248
Spleen	(g)	0.736±0.099	0.798±0.111	0.821±0.138	0.767±0.096	0.792±0.121
	(g%)	0.161±0.021	0.175±0.020	0.182±0.026	0.166±0.017	0.172±0.022
Kidneys	(g)	2.944±0.226	3.003±0.229	3.062±0.247	3.063±0.198	3.079±0.304
	(g%)	0.649±0.053	0.660±0.035	0.673±0.048	0.662±0.040	0.668±0.058
Adrenals	(mg)	54.02±7.21	57.68±8.79	57.93±6.62	55.82±6.31	54.40±6.64
	(mg%)	11.90±1.76	12.66±1.64	12.78±1.50	12.05±1.32	11.83±1.65
Testes	(g)	3.304±0.252	3.296±0.259	3.395±0.299	3.276±0.214	3.345±0.203
	(g%)	0.728±0.075	0.726±0.072	0.751±0.074	0.708±0.050	0.727±0.053
Epididymides	(g)	0.683±0.207	0.704±0.182	0.650±0.137	0.598±0.130	0.683±0.242
	(g%)	0.151±0.046	0.155±0.040	0.143±0.031	0.129±0.028	0.148±0.053

Each value shows mean±S.D.

Table 5 Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris (2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6- (1H,3H,5H)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0						30						100						300						1000					
Incidence and grade	N ^a	A ^b	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Findings																														
Heart	[12] ^c																								[12]					
Cellular infiltration, histiocyte	8	4	4	0	0	0														8	4	4	0	0	0					
Lung	[12]																								[12]					
Hemorrhage	12	0																		11	1	1	0	0	0					
Liver	[12]						[12]						[12]						[12]						[12]					
Necrosis, focal, hepatocyte	11	1	1	0	0	0	12	0					12	0					12	0					12	0				
Microgranuloma	2	10	5	5	0	0	5	7	4	3	0	0	6	6	5	1	0	0	4	8	7	1	0	0	5	7	3	4	0	0
Spleen	[12]						[12]						[12]						[12]						[12]					
Hematopoiesis, extramedullary	12	0					9	3	3	0	0	0	8	4	4	0	0	0	9	3	3	0	0	0	7	5	5	0	0	0
Kidney	[12]																								[12]					
Hyaline droplet, tubular epithelium	8	4	4	0	0	0														8	4	4	0	0	0					
Prostate	[12]																								[12]					
Cellular infiltration, lymphoid cell	6	6	4	2	0	0														6	6	4	2	0	0					
Harderian gland	[12]																								[12]					
Cellular infiltration, lymphoid cell	10	2	2	0	0	0														12	0									

Grade of histopathological findings; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of males examined.

No remarkable changes were seen in the trachea, pancreas, salivary gland (sublingual and submandibular), esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, lymph node (submandibular and mesenteric), urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, brain (cerebrum, cerebellum or medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, or bone marrow (sternum or femur).

Examined only for the liver and spleen in the 30, 100 and 300 mg/kg groups.

Table 6 Organ weight of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris (2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of dams		11	11	12	12	12
Body weight	(g)	338.5±18.1	347.5±18.1	355.6±20.9	351.6±14.8	349.3±16.0
Brain	(g)	1.951±0.060	1.935±0.043	1.953±0.051	1.942±0.060	1.946±0.094
	(g%)	0.577±0.024	0.559±0.034	0.551±0.027	0.553±0.026	0.556±0.036
Pituitary	(mg)	22.21±3.15	22.18±2.42	23.19±3.27	24.33±2.77	22.71±2.63
	(mg%)	6.55±0.72	6.39±0.65	6.55±0.98	6.91±0.70	6.51±0.74
Thyroids	(mg)	19.29±3.97	19.05±2.17	21.77±3.78	18.00±2.57	18.20±2.80
	(mg%)	5.68±1.08	5.50±0.70	6.15±1.05	5.14±0.85	5.21±0.78
Thymus	(mg)	204.46±56.14	234.73±67.93	249.35±49.40	253.42±54.08	229.23±74.10
	(mg%)	60.08±15.52	67.53±19.22	70.53±15.69	72.08±15.26	65.40±20.19
Heart	(g)	1.044±0.103	1.066±0.081	1.119±0.076	1.088±0.099	1.049±0.058
	(g%)	0.308±0.026	0.306±0.016	0.314±0.016	0.309±0.030	0.301±0.023
Liver	(g)	13.284±1.104	13.268±1.437	13.570±2.264	13.538±1.284	13.304±1.209
	(g%)	3.931±0.369	3.817±0.340	3.824±0.625	3.852±0.323	3.815±0.369
Spleen	(g)	0.693±0.116	0.732±0.092	0.710±0.090	0.767±0.110	0.727±0.146
	(g%)	0.205±0.029	0.211±0.024	0.198±0.020	0.218±0.034	0.208±0.038
Kidneys	(g)	2.003±0.159	1.978±0.136	2.013±0.133	2.003±0.208	2.048±0.211
	(g%)	0.593±0.044	0.571±0.044	0.566±0.034	0.571±0.055	0.588±0.062
Adrenals	(mg)	75.63±7.99	83.82±9.39	83.48±14.63	79.03±8.28	78.52±12.25
	(mg%)	22.41±2.80	24.12±2.23	23.63±4.61	22.52±2.59	22.54±3.73
Ovaries	(mg)	108.93±11.30	107.25±14.76	106.13±11.32	106.07±11.27	103.23±11.14
	(mg%)	32.25±3.59	30.94±4.63	29.89±3.20	30.23±3.50	29.65±3.66

Each value shows mean±S.D.

Table 7 Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0						30						100						300						1000					
Incidence and grade	N ^a	A ^b	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Findings	[12] ^c						[12]						[12]						[12]						[12]					
Liver	[12] ^c						[12]						[12]						[12]						[12]					
Necrosis, massive, hepatocyte	12	0					11	1	0	1	0	0	12	0					12	0					12	0				
Necrosis, focal, hepatocyte	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	10	2	2	0	0	0	12	0				
Microgranuloma	12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary	12	0					12	0					12	0					12	0					10	2	2	0	0	0
Spleen	[12]																		[12]											
Hematopoiesis, extramedullary	0	12	3	8	1	0													2	10	1	5	4	0						
Kidney	[12]																		[12]											
Vacuolization, urinary tubule	11	1	1	0	0	0													12	0										
Cellular infiltration, lymphoid cell	11	1	1	0	0	0													10	2	2	0	0	0						
Urinary bladder	[12]																		[12]											
Ulcer	11	1	1	0	0	0													12	0										
Hemorrhage, propria	11	1	1	0	0	0													12	0										
Cellular infiltration, lymphoid cell, propria	11	1	1	0	0	0													12	0										

Grade of histopathological findings; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of females examined.

No remarkable changes were seen in the heart, lung, trachea, pancreas, salivary gland (sublingual and submandibular), esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, lymph node (submandibular and mesenteric), ovary, uterus, vagina, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, brain (cerebrum, cerebellum, or medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland, bone marrow (sternum or femur), or mammary gland.

Examined only for the liver in the 30, 100, and 300 mg/kg groups.

Table 8 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.6±0.5	3.1±0.9	3.4±0.7	3.4±0.5	3.3±0.9
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	12
Copulation index (%) ^a	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	2.9±0.9	2.7±1.6	3.3±0.8	2.6±1.1	2.3±1.1
Conceiving days 1-5	11	11	12	12	12
Conceiving days ≥6	0	1	0	0	0
Number of pregnant females	11	11	12	12	12
Fertility index (%) ^b	100.0	91.7	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females with live pups	11	11	12	12	12

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 9 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	12	12	12
Length of gestation (days)	22.45±0.52	22.27±0.47	22.25±0.45	22.08±0.29	22.25±0.45
Corpora lutea	18.2±2.5	18.3±3.2	17.0±2.0	17.0±2.6	18.4±3.4
Implantation scars	15.6±2.5	16.8±3.2	15.6±1.6	15.7±1.9	16.2±1.6
Implantation index (%) ^{a)}	86.5±12.9	92.2±9.4	92.0±7.3	92.8±6.9	89.4±11.0
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Pups born	14.7±3.0	15.9±3.3	14.8±1.6	14.8±1.7	15.8±1.3
Stillbirths	0.3±0.6	0.1±0.3	0.4±1.2	0.3±0.5	0.2±0.4
Live pups born	14.5±2.8	15.8±3.2	14.3±2.1	14.4±1.7	15.6±1.2
Sex ratio ^{c)}	1.15±0.68	1.25±0.67	1.08±0.50	0.91±0.37	1.28±1.06
Delivery index (%) ^{d)}	93.5±7.8	94.5±6.6	94.8±4.5	94.3±5.1	97.7±2.9
Birth index (%) ^{e)}	92.1±8.1	94.1±7.0	92.2±10.2	92.3±5.6	96.6±3.8
Live birth index (%) ^{f)}	98.5±3.8	99.5±1.5	97.1±8.4	97.8±3.3	98.9±2.5
Live pups on day 4 of lactation	14.4±2.9	15.6±3.1	14.3±2.1	14.3±1.8	15.3±1.2
Viability index (%) ^{g)}	99.3±2.4	98.9±2.4	99.4±2.0	98.8±2.9	98.5±3.7
External anomalies (%) ^{h)}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Body weight of pups (g)					
Male Day 0	6.87±0.55	6.69±0.42	6.74±0.58	6.73±0.38	6.87±0.38
4	10.93±1.50	10.74±1.20	11.14±1.38	10.99±1.04	10.93±0.86
Female Day 0	6.54±0.70	6.28±0.41	6.48±0.52	6.35±0.33	6.42±0.34
4	10.39±1.68	10.08±1.07	10.63±1.37	10.43±1.09	10.45±0.65

Each value shows mean±S.D. per dam.

a) (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c) Number of male pups born/number of female pups born.

e) (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

g) (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

b) (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d) (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f) (Number of live pups born/number of pups born)×100.

h) (Number of pups with external anomalies/number of live pups)×100.

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)- トリオンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine- 2,4,6-(1H,3H,5H)-trione on Bacteria

要約

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium*(TA100, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のいずれの菌株とも156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ のそれぞれ6用量で実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から；また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現：国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31日ならびに平成11年6月29日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩、0.2%クエン酸・1水塩、1%リン酸二カリウム・

無水塩、0.192%リン酸一アンモニウム、0.066%水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID:No. 1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10: タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5. 被験物質

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン(ロット番号: 00915-1)は純度99.0%(不純物としてイソシアヌル酸を含む)の白色粉末である。本剤は水に易溶で、アセトン、

メタノールに可溶である。水、光に対して安定であり、生理食塩液中でも安定である。日産化学工業(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所(4℃)で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)で溶解して調製原液を準備した。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 µg/plateの用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群およびS9 mix添加群のいずれの用量においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群、S9 mix添加群とも5000 µg/plateを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2:和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(Na₃N₂:和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:Aldrich社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 µL、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 µL、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 µL添加した。さらに、試験菌液100 µLを加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45℃に保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡(×60)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれにおいても、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン処理による生育阻害作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー計数時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の類縁体である1,3,5-trichloro-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trioneについてはAmes試験で陰性²⁾との報告があり、1,3,5-triethylhexahydro-1,3,5-triazine, triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trioneならびにtrichloromelamineの変異原性に関する報告はなかった。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976).
- 3) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集,” 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp.130-131.

連絡先

試験責任者：中嶋 圓

試験担当者：嶋田佐和子，菊池正憲，板倉真由実

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Sawako Shimada, Masanori Kikuchi,

Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Results of the bacterial reversion test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (1st trial) [direct method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	100	97	95	12	12	9	24	24	19	17	16	21	5	6	6
		[97 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
	156	103	101	96	11	11	9	21	23	17	20	16	15	5	5	7
		[100 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 1]			[20 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
	313	95	88	93	9	7	8	22	20	22	15	17	18	5	5	6
		[92 $\pm$ 4]			[8 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]		
	625	107	101	100	9	6	8	17	22	18	20	24	16	3	4	2
		[103 $\pm$ 4]			[8 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 4]			[3 $\pm$ 1]		
Positive control	1250	84	90	90	6	7	9	17	16	24	19	16	14	2	6	4
		[88 $\pm$ 3]			[7 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 4]			[16 $\pm$ 3]			[4 $\pm$ 2]		
	2500	91	89	87	9	10	8	21	17	14	14	18	16	6	5	5
		[89 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 4]			[16 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]		
	5000	96	103	106	10	13	11	17	16	18	14	12	14	7	4	6
		[102 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 2]		
		475	469	484 ^a	384	369	355 ^b	122	136	138 ^c	651	663	659 ^c	416	438	406 ^d
		[476 $\pm$ 8]			[369 $\pm$ 15]			[132 $\pm$ 9]			[658 $\pm$ 6]			[420 $\pm$ 16]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2 Results of the bacterial reversion test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (1st trial) [activation method:+S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	104	104	8	6	8	23	27	22	24	28	21	9	10	9
		[104 $\pm$ 0]			[7 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 3]			[24 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 1]		
	156	104	104	102	6	6	8	25	24	27	19	17	18	7	11	11
		[103 $\pm$ 1]			[7 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 1]			[10 $\pm$ 2]		
	313	108	106	103	9	10	6	18	21	17	19	25	18	11	8	11
		[106 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 2]		
	625	94	93	94	8	6	9	24	19	21	22	23	19	9	13	8
		[94 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 3]		
Positive control	1250	89	94	95	10	7	8	27	24	22	25	22	17	11	7	6
		[93 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 4]			[8 $\pm$ 3]		
	2500	89	91	94	8	8	6	21	20	23	24	28	22	8	14	9
		[91 $\pm$ 3]			[7 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 3]		
	5000	92	88	93	9	7	7	22	21	26	19	26	20	8	7	6
		[91 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 4]			[7 $\pm$ 1]		
		785	822	853 ^a	349	348	363 ^b	653	667	646 ^c	410	422	401 ^d	142	148	132 ^b
		[820 $\pm$ 34]			[353 $\pm$ 8]			[655 $\pm$ 11]			[411 $\pm$ 11]			[141 $\pm$ 8]		

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of the bacterial reversion test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione (2nd trial) [direct method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	96	87	13	10	15	23	29	25	16	15	17	8	6	4
		[96 $\pm$ 9]			[13 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 3]			[16 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 2]		
	156	87	97	86	7	12	9	27	21	20	14	15	14	9	6	9
		[90 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 2]		
	313	106	85	85	8	10	10	23	30	28	17	16	9	8	9	6
		[92 $\pm$ 12]			[9 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 4]			[8 $\pm$ 2]		
	625	106	95	90	11	12	8	22	22	24	9	14	12	5	8	11
		[97 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 1]			[12 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 3]		
	1250	102	89	83	9	9	6	20	27	20	15	15	10	6	9	8
		[91 $\pm$ 10]			[8 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]		
	2500	94	100	83	9	10	6	23	23	28	16	13	15	10	7	5
		[92 $\pm$ 9]			[8 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 3]		
	5000	81	101	90	8	10	7	21	23	17	11	13	17	4	6	5
		[91 $\pm$ 10]			[8 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 3]			[5 $\pm$ 1]		
Positive control		445	432	416 ^a	371	375	335 ^b	107	119	124 ^c	655	621	607 ^d	489	426	460 ^d
		[431 $\pm$ 15]			[360 $\pm$ 22]			[117 $\pm$ 9]			[628 $\pm$ 25]			[458 $\pm$ 32]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of the bacterial reversion test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione (2nd trial) [activation method:+S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	102	112	7	8	9	23	25	27	24	22	26	14	17	15
		[106 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[15 $\pm$ 2]		
	156	86	87	82	12	9	7	22	22	23	24	23	26	14	9	9
		[85 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 3]		
	313	100	93	104	11	12	8	19	23	25	18	28	23	12	7	11
		[99 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 3]		
	625	99	86	101	14	10	9	19	29	28	27	22	18	7	7	11
		[95 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 3]			[25 $\pm$ 6]			[22 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 2]		
	1250	80	83	87	12	11	7	23	26	30	21	17	24	14	13	11
		[83 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 4]			[21 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 2]		
	2500	100	88	86	11	9	12	26	27	29	22	25	18	16	14	13
		[91 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 2]		
	5000	80	80	94	9	8	13	21	24	25	18	25	20	7	10	10
		[85 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 2]		
Positive control		888	892	885 ^a	411	365	400 ^b	659	660	675 ^c	408	405	417 ^d	127	139	145 ^d
		[888 $\pm$ 4]			[392 $\pm$ 24]			[665 $\pm$ 9]			[410 $\pm$ 6]			[137 $\pm$ 9]		

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの チャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine- 2,4,6-(1H,3H,5H)-trione on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法ならびに連続処理法とも10 mM相当の濃度を含む653~2612 $\mu\text{g/mL}$ の3用量を設定した。短時間処理法ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、短時間処理ならびに連続処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数14の細胞を、染色体異常試験では同9の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス(株))に、メンブランフィルター(0.45 μm :Featuring Corning and Costar Products)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56 $^{\circ}\text{C}$, 30分)済み仔牛血清(GIBCO Life Technologies, Inc)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4 $^{\circ}\text{C}$)に保存した。

3. 培養条件

CO_2 インキュベーター(Formaおよび三洋電機メディ

カシステム(株))を用い、 CO_2 濃度5%, 37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製された。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl_2	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 μmol
精製水	残量

5. 被験物質

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン(ロット番号:00915-1)は純度99.0%(不純物としてイソシアヌル酸を含む)の白色粉末である。本剤は水に易溶で、アセトン、メタノールに可溶である。水、光に対して安定であり、生理食塩液中でも安定である。日産化学工業(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所(4 $^{\circ}\text{C}$)で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方生理食塩液(株)大塚製薬工場)で溶解して調製原液を準備した。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウェルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。